

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870877

研究課題名(和文) ヒト乳がんにおけるがん幹細胞形質獲得機構の解明

研究課題名(英文) Identification of microRNA-27b as a master regulator for breast cancer stem cell generation

研究代表者

高橋 陵宇 (Ryou-u, Takahashi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：10625510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン受容体陽性のルミナルタイプの乳がん細胞において、非翻訳型RNAの1つであるmicroRNA-27b(miR-27b)の発現低下により抗がん剤耐性が誘導されることを明らかにした。所属機関の国立がん研究センターの臨床検体と乳がん細胞株を用いた解析から、miR-27bの発現低下により抗がん剤の排出および腫瘍形成能が亢進したside-populationの形成が誘導されることを明らかとした。本成果から核酸医薬などを用いてmiR-27bの発現を制御するアプローチが難治性乳がんを対象とした新たな治療方法の開発につながることを示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we identified microRNA-27b (miR-27b) as a key regulator for the generation of cancer stem cells (CSCs). In breast cancer, down-regulation of miR-27b induced the generation of side-population that shows CSC properties such as drug resistance and high tumorigenicity. MiR-27b reduced the side-population via direct repression of ectonucleotide pyrophosphatase 1 (ENPP1), which is involved in type II diabetes (T2D) development. ENPP1 induced the generation of the side-population by promoting the expression and cell surface localization of ABCG2. More importantly, a significant correlation between ENPP1 expression and breast tumor malignancy in clinical samples was observed. Overall, our study demonstrates that a T2D-associated gene plays an important role in the regulation of CSC properties and suggests that conventional chemotherapy with modulating miR-27b expression by RNA-based treatments may improve the therapeutic outcomes of breast cancer patients.

研究分野：乳がん、抗がん剤耐性

キーワード：がん治療 乳がん microRNA がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、さまざまなヒト原発がんよりがん幹細胞を同定し解析する試みが国内国外を問わず多く行われ、そのような細胞集団が高い造腫瘍性と薬剤耐性を示すことが明らかにされている。乳がんにおいては、2003年にCD44⁺/CD24^{low/-}の細胞集団ががん幹細胞として報告された (Al-Hajj *et al.* PNAS 2003)。また、非がん幹細胞画分である CD44⁺/CD24⁺からの CD44⁺/CD24^{low/-}画分の形成が上皮間葉移行 (EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition) により誘導されることも報告された (Mani *et al.* Cell 2008)。一方で、現在に至るまで、乳がん幹細胞において抗がん剤耐が獲得されるメカニズムを詳細に解析した報告はほとんどされていない。この1つの要因として薬剤耐性株の樹立が容易ではないことが挙げられる。

申請者らは、これまでにヒト乳がん細胞においてドセタキセル耐性化に伴い非翻訳型 RNA である microRNA(miRNA)の発現が低下することを報告している (Yamamoto *et al.*, Mol cancer. 2011)。その後の解析から、(1) 上記の miRNA 中で miR-27b の発現低下によりドセタキセル耐性が誘導されること、(2) 臨床検体において有意に miR-27b の発現が低下していることを見出している。これらの実験系を用いることで、これまで解析が困難であった抗がん剤耐性が誘導される機序や、それに伴いがん幹細胞画分が形成されるかどうかを明らかにできると考えられた。また、本研究は上記のような生物学的特性を理解するのに有用なだけでなく、抗がん剤に対する感受性予測さらにその治療効果の改善といった新たな診断・治療方法の開発にも応用できる点で非常に有用であると考えられた

ため本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、1) miR-27b の発現を抑制および亢進させた乳がん細胞株および 2) 臨床検体を用いて下記の3点を明らかにする。

- ① miR-27b の標的分子群の中からドセタキセル耐性を誘導する分子を同定し、その分子メカニズムを明らかにする。
- ② miR-27b の発現を抑制あるいは亢進させた細胞株と免疫不全マウスを用いて動物実験を行い、造腫瘍性の評価をする。これにより抗がん剤耐性、かつ、造腫瘍性を獲得するのに、miR-27b の発現低下が必要条件に相当するかを明らかにする。
- ③ 上記①と②から同定された miR-27b の標的分子の発現と予後との関連に関して臨床検体を用いた解析から明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 細胞株の樹立とドセタキセル感受性の評価:
miR-27b の発現を抑制した乳がん細胞株(MCF7 miR-27b kd と ZR75-1 miR-27b kd)と亢進させた細胞株(MCF7 miR-27b oe と ZR75-1 miR-27b oe)をレンチウイルスにより樹立した。これらの細胞株を用いてドセタキセルに対する感受性の変化を評価した。
- (2) フローサイトメトリーによる解析:
方法 1)で樹立した細胞株において、薬剤排出能が亢進している細胞集団である Side Population (SP 画分) の割合を Hoechst 33342 を用いて検討した。

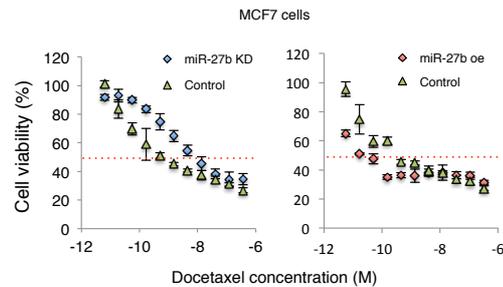
- (3) 動物モデルを用いた造腫瘍性の評価:
4 週齢のメスの NOD-Scid マウスを用いて MCF7 細胞の SP 画分が腫瘍形成能を有するかを検討した。
- (4) mRNA マイクロアレイ 解析:
miR-27b の標的分子を探索する目的で MCF7 miR-27b kd と MCF7 miR-27b oe 細胞株を用いて miR-27b の発現と逆相関を示す遺伝子群の探索を行った。また、上記の候補遺伝子群の中から 3'非翻訳領域(3'-untranslated region: 3'-UTR)に miR-27b の標的配列を持つ遺伝子群を抽出した。
- (5) 定量 PCR 法と luciferase assay:
マイクロアレイの解析から同定された miR-27b の標的遺伝子を対象として、MCF7 細胞においてドセタキセル添加後の遺伝子発現変化を定量 PCR 法により評価した。また、Firefly luciferase 遺伝子の 3'-UTR に標的遺伝子の 3'-UTR を挿入したコンストラクトを作製し、miR-27b と co-transfection することで luciferase の活性が抑制されるのかも併せて検討した。
- (6) 乳がん検体を用いた解析
miR-27b とその標的遺伝子の発現に関して乳がん検体(26 症例)を用いて解析した。また、標的遺伝子の発現変動をがん部 (53 症例) と非がん部 (15 症例) の組織を用いて検討した。

4. 研究成果

- (1) miR-27b をノックダウンした細胞株におけるドセタキセルの感受性評価:
miR-27b をノックダウンした MCF7 細胞 (MCF7 miR-27b kd) においてドセタキセル

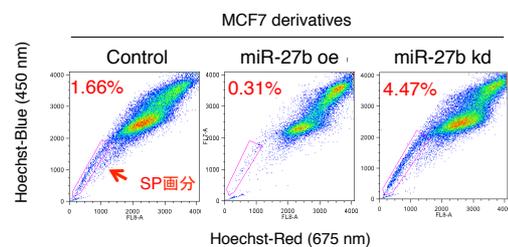
ルの IC50 が約 10 倍亢進していることが確認された。また、逆に miR-27b を過剰発現させた細胞株(MCF7 miR-27b oe) ではドセタキセルに対する感受性が回復していることが確認された (図 1)。

図1: ドセタキセルに対する感受性の変化



- (2) miR-27b をノックダウンした細胞株における SP 画分とがん幹細胞画分:
miR-27b の発現抑制によりドセタキセルに対する耐性が亢進したことから、薬剤排出能を評価した。ヘキストで染色した場合に薬剤排出能が亢進している細胞集団は染色されず SP 画分として検出されるので、その割合を算出した。その結果、miR-27b の発現抑制により SP 画分の形成が誘導された(図 2)。また、同様の結果が ZR75-1 細胞でも観察された。

図2: SP画分の変動

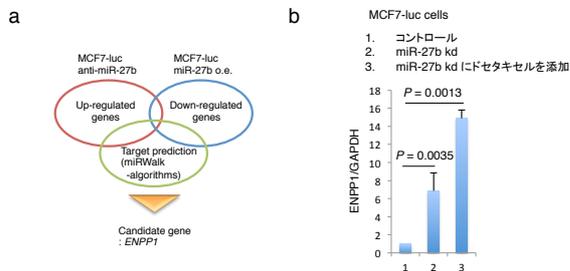


- (3) SP 画分における造腫瘍性の評価
MCF7 細胞で検出された SP 画分が造腫瘍性を示すかを動物実験により検討し

た。4週齢のメス NOD-Scid マウスに予め 96 時間ドセタキセルで処理した MCF7 細胞 (control, miR-27b oe, miR-27b kd) を移植し造腫瘍性を評価した。その結果、miR-27b を過剰発現させた細胞株では造腫瘍性が著しく抑制された。

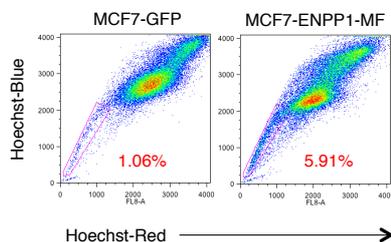
- (4) マイクロアレイを用いた miR-27b の標的分子の探索:miR-27b の標的遺伝子を探索する目的で MCF7 miR-27b kd と MCF7 miR-27b oe 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、miR-27b と逆相関する遺伝子群の絞り込みを行った。これらの候補遺伝子群の中からドセタキセルの添加に伴い発現の上昇が見られる遺伝子として ENPP1(Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1)を同定した (図 3)。

図3: マイクロアレイ解析を用いたmiR-27bの標的遺伝子の探索



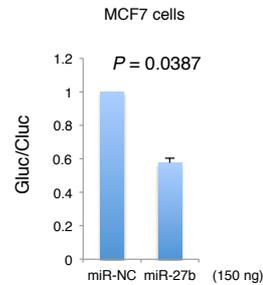
- (5) miR-27b の新規標的分子の機能解析: ENPP1 を MCF7 細胞に過剰発現させた場合にも SP 画分の形成が誘導されることも明らかとなった (図 4)。

図4: ENPP1過剰発現細胞におけるSP画分の割合



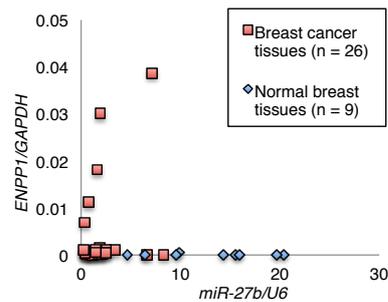
また、ENPP1 の 3'UTR を挿入した Luciferase construct を作製し miR-27b による抑制効果を検討したところ、有意に Luciferase 活性が抑制された (図 5)。

図5: 3'UTRアッセイの結果



- (6) 乳がん検体を用いた miR-27b およびその標的分子の発現の評価: 乳がん検体を用いて miR-27b と ENPP1 の発現に逆相関が見られるかを検討した。その結果、Lumina 型の乳がん 26 症例において miR-27b と ENPP1 の発現に逆相関が見られた (図 6)。

図6: 臨床検体における ENPP1とmiR-27bの発現解析



- (7) 結語 以上の結果から、Luminal 型の乳がん症例において miR-27b の発現低下によりドセタキセル耐性が誘導されることが示された。また、その機序として miR-27b の標的分子である ENPP1 が高い薬剤排出能と造腫瘍性を示す SP 画分

の形成を誘導することを明らかにした。
また、今後の課題として ENPP1 がどの
ようにして造腫瘍性を制御しているか
を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Ishiguro T, Sato A, Ohata H, Ikarashi Y, Takahashi RU, Ochiya T, et al. Establishment and Characterization of an In Vitro Model of Ovarian Cancer Stem-like Cells with an Enhanced Proliferative Capacity. *Cancer Res.* 2016;76(1):150-60. (査読有り)
2. Takahashi RU, Miyazaki H, Takeshita F, Yamamoto Y, Minoura K, Ono M, et al. Loss of microRNA-27b contributes to breast cancer stem cell generation by activating ENPP1. *Nat Commun.* 2015;6:7318. (査読有り)
3. Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T. The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2015;7(2):598-616. (査読有り)
4. Ono M, Tsuda H, Kobayashi T, Takeshita F, Takahashi RU, Tamura K, et al. The expression and clinical significance of ribophorin II (RPN2) in human breast cancer. *Pathol Int.* 2015;65(6):301-8. (査読有り)
5. Fujita T, Chiwaki F, Takahashi RU, Aoyagi K, Yanagihara K, Nishimura T, et al. Identification and Characterization of CXCR4-Positive Gastric Cancer Stem Cells.

PLoS One. 2015;10(6):e0130808. (査読有り)

6. Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T. The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Front Genet.* 2014;4:295. (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

平成 27 年

1. 国内: 日本癌学会学術総会 (口頭発表), 名古屋
高橋陵宇, 宮崎裕明, 竹下文隆, 山本雄介, 小野麻紀子, 田村 研治, 落谷孝広
乳がんにおけるがん幹細胞形質獲得機構の解明
平成 27 年 10 月 8 日
2. 国外: *Molecular Medicine and Diagnostics* (招待口演), ロンドン
Ryou-u Takahashi and Takahiro Ochiya
Loss of microRNA-27b-mediated gene repression promotes the generation of breast cancer stem cells
平成 27 年 8 月 26 日

平成 26 年

1. 国内: 日本癌学会学術総会 (ポスター発表), 横浜
高橋陵宇, 宮崎裕明, 田村 研治, 落谷孝広
乳がんにおける幹細胞形質を制御する因子の同定とその機能解析
平成 26 年 9 月 25 日
2. 国外: 9th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine (招待口演), ギリシヤ

Ryou-u Takahashi, Hiroki Miyazaki and
Takahiro Ochiya

Loss of MicroRNA-27b-mediated Gene
Repression Promotes Generation of Breast
Cancer Stem Cells

平成 26 年 10 月 8 日

〔図書〕（計 1 件）

1. Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T.
Non-coding RNAs in Cancer and Cancer
Stem Cells, edited by Babashah, Sadegh,
Cancer Stem Cells: Emerging Concepts and
Future Perspectives in Translational
Oncology, Springer, 131-53, 2015.

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 1 件）

名称：腫瘍治療剤
発明者：落谷孝広・高橋陵宇
権利者：国立研究開発法人国立がん研究セン
ターおよび旭化成ファーマ株式会社
種類：特許
番号：5812491 号
取得年月日：2015 年 10 月 2 日日
国内外の別：日本および米国

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.nccri.ncc.go.jp/jimu/030/040/20151209101200.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
高橋 陵宇 (Takahashi Ryou-u)
国立研究開発法人国立がん研究センター・研
究員 研究者番号：10625510

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()

研究者番号：